

人 ASTN1、DLX1、ITGA4、RXFP3、SOX17、ZNF671 基因甲基化检测试剂盒（荧光 PCR 法） 说明书

【产品名称】

人 ASTN1、DLX1、ITGA4、RXFP3、SOX17、ZNF671 基因甲基化检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【包装规格】

10 人份/盒

【预期用途】

本产品用于体外定性检测人宫颈脱落细胞中 ASTN1、DLX1、ITGA4、RXFP3、SOX17、ZNF671 基因的甲基化状态。

本产品适用于 12 种高危 HPV（hrHPV）基因型（31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68 型）检测阳性的 30 岁以上女性人群，帮助识别是否需要进行阴道镜检查，达到分流管理的目的。

hrHPV 持续感染是导致宫颈癌的主要病因，但大多数感染是一过性且无临床症状，能够通过自身免疫系统调节而清除，仅有极少数 hrHPV 持续感染的患者可能会进展为宫颈癌前病变甚至宫颈癌^[1]。使用本产品检测，当检测结果为阴性时，提示无宫颈病变或宫颈病变级别较低，可避免阴道镜及组织活检检查，做好定期复查；检测结果为阳性时，提示宫颈病变级别较高，需进一步进行阴道镜和/或组织活检检查^[2]。

【检验原理】

本产品包括三个步骤：细胞裂解、亚硫酸氢盐转化和实时荧光 PCR。

步骤 1，细胞裂解：使用试剂盒内的裂解液对宫颈脱落细胞进行裂解，释放基因组 DNA；

步骤 2，亚硫酸氢盐转化：细胞裂解后用亚硫酸氢盐进行转化处理，DNA 上未发生甲基化的胞嘧啶 C 因脱氨基反应变成尿嘧啶 U，而发生甲基化的胞嘧啶 C 则不会被亚硫酸氢盐转化；

步骤 3，实时荧光 PCR：以转化后的 DNA 为模板做荧光 PCR 扩增，特异性的引物只能扩增发生甲基化的基因，从而检测 6 个基因 ASTN1（Marker1）、DLX1（Marker2）、ITGA4（Marker3）、RXFP3（Marker4）、SOX17（Marker5）、ZNF671（Marker6）的甲基化状态。

本产品同时设置了内部质控 Marker QC 和 Marker QM，Marker QC 用于评估样本 DNA 是否足量以及亚硫酸氢盐转化质量是否合格，Marker QM 用于评估女性样本的正常甲基化状态。

【主要组成成分】

组分	主要成分	包装量
反应液	dNTPs、Taq DNA 聚合酶、Eva Green 染料	1.1 mL/支×1
八联管	6 个基因和 MarkerQC、Marker QM 引物	12 条/盒×1
八联管盖	/	12 条/包×1
反应水	超纯水	2 mL/支×1
阳性质控	亚硫酸氢盐转化后的 SiHa 细胞 DNA 和人基因组 DNA 的混合液	90 μL/支×1
裂解液	裂解液	500 μL/支×1

注：请勿互换、混合或合并不同批号的试剂盒中的组分。

需要但未提供材料：

亚硫酸氢盐转化试剂盒：甲基化检测样本前处理试剂盒（上海捷诺生物科技有限公司，沪徐械备 20200007 号），或 EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit (200)（QIAGEN，货号：59826）。

细胞保存液：细胞保存液 PreservCyt Solution（Hologic, Inc.，国械备 20140197），包装规格：20 mL。

采样拭子：一次性使用宫颈采样拭子（宁波华莱斯医疗器械有限公司，浙械注准 20172411163）。

【储存条件及有效期】

储存条件：2~8℃保存。

有效期：12 个月。

生产日期及失效日期见标签。

【适用仪器】

ABI 7500 实时荧光 PCR 仪

【样本要求】

1. 适用样本类型：宫颈脱落细胞。
2. 样本采集：需使用一次性宫颈采样拭子采样后，立即将其转移至细胞保存液中。
3. 样本保存和运输条件：建议室温保存不超过 4 周，2~8℃保存不超过 12 周。2~30℃条件下运输不超过 3 天。

【检验方法】

1. 液基细胞学样本的细胞裂解

本试剂盒中包含细胞裂解所需的细胞裂解液，根据以下步骤操作：

- a. 以最大速度涡旋混匀样本 5 秒，并立即转移 1 mL 样本到 1.5mL EP 管中；
- b. 10000×g 离心 5 分钟；
- c. 小心移除上清液，最多移出 980 μL。注意：根据沉淀物量及样本状态决定移出量的体积；
- d. 向沉淀物中加入 40 μL 裂解液，并以最大速度涡旋混匀样本 3 秒；
- e. 将 EP 管放置在恒温摇匀仪中，设置 60℃，1000rpm 孵育样本 30 分钟，取出 40 μL 裂解样本进行后续的亚硫酸氢盐转化处理。

2. 亚硫酸氢盐处理和纯化 DNA

参照厂家说明书操作使用亚硫酸氢盐转化试剂盒，**最终使用 20 μL 超纯水洗脱样本 DNA。**

3. 配制 PCR 反应体系和加样

- a. 向步骤 2 洗脱得到的样本 DNA 中加入 70μL 反应水,以最大速度涡旋混匀 3 秒，短暂离心；
- b. 从试剂盒中取出反应液和八联管，绿色管盖的八联管用于样本检测，红色管盖的八联管用于阳性质控，黄色管盖的八联管用于阴性质控（反应水）；
注意：八联管的方向。管口编号 1~8 分别代表 Marker 1~Marker6、Marker QC 和 Marker QM。
- c. 每个八联管孔中加入 10μL 反应液；
注意：因为八联管中已包含引物，为防止污染，每次加液后换枪头。
- d. 每条八联管检测一份样本，绿色管盖的八联管的每孔加入 10μL 样本；
- e. 黄色管盖的八联管每孔加 10μL 反应水，红色管盖的八联管每孔加 10μL 阳性质控；
注意：每次加样后换枪头，八联管有色管盖丢弃；
- f. 加样完成后盖上八联管透明管盖（试剂盒提供）；
注意：取出和盖上管盖时应避免接触管盖内侧；确保管盖已盖紧；
- g. 以最大速度涡旋充分混匀所有八联管 3 秒，短暂离心。

4. PCR 扩增

根据 PCR 仪器制造商提供的说明书对仪器进行以下设置：

- 1) 设置 Setup→实验属性 Experiment Properties，选择以下设置：7500（96 孔）；Quantitation - Standard Curve；勾选 SYBR® Green Reagents, Standard（~2h 结束），并勾选“Including Melt Curve”；
- 2) 设置 Setup→板设置 Plate setup→Define Targets and Samples，确定引物和样本名称；
- 3) 参比荧光（Reference Dye）：ROX；每孔反应体积 20μL；采集信号：“Cycling Stage, Step 2”（30 秒 Hold）和“Melt Curve Stage, Step 3”（1%heating phase）。

表 1：PCR 运行参数

步骤	温度	时间	升降温率	循环数
Step 1	94°C	60 秒	100%	/
Step 2	94°C	15 秒	100%	42
	67°C	30 秒*	100%	
Step 3	95°C	15 秒	100%	熔解曲线分析
	60°C	20 秒	100%	
	95°C	30 秒	1%*	
	30°C	60 秒	100%	

*设置采集信号

表 2：阈值和基线

阈值	基线起始 Ct	基线结束 Ct
0.5	5	20

5. PCR 结果导出及数据整理

- a. 请参照 PCR 仪器制造商提供的说明书，从 ABI7500 导出数据；
- b. 使用 Microsoft Excel 打开导出的结果文件；
- c. 可参考以下格式排列数据；

表 3：样本数据分析表

	Marker 1						Marker QC		Marker QM	
	Ct	Tm	ΔCt	Ct	Tm	ΔCt	Ct	Tm	Ct	Tm
样本 1										
样本 2										
样本 3										
.....										
阳性质控										
阴性质控										

6 个宫颈癌甲基化标志物（Marker 1 ~ Marker 6）

ΔCt 值的计算公式为 ΔCt = Ct（Marker X）-Ct（Marker QC）

- d. 导出数据 Ct 值与 Tm 值均在在参考值范围内（表 4 和表 5），查看扩增曲线、熔解曲线的有效性

- i. 有效扩增曲线、熔解曲线如图 1 所示，其 Ct 值与 Tm 值有效，可用于后续结果分析。
- ii. 无效扩增曲线、熔解曲线如图 2 所示，其 Ct 值与 Tm 值不作为有效值，需重复实验。

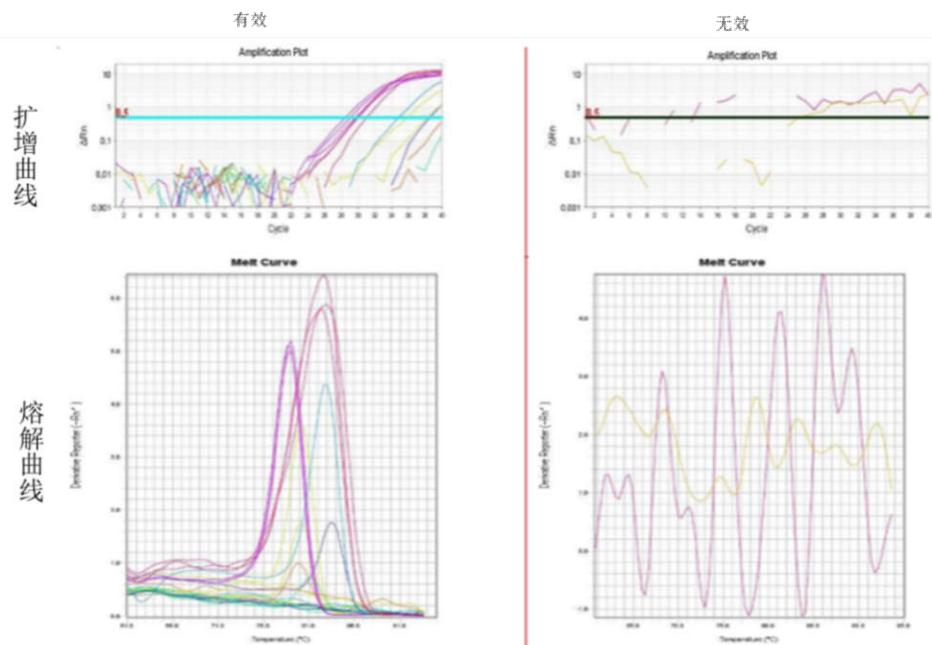


图 1

图 2

6. 质量控制

外部质控:

a. 阴性质控有效性:

阴性质控没有出现 Ct 值或 Tm 值，或 Tm 值不在参考值范围内（表 4 和表 5），则阴性质控有效；反之，阴性质控无效，需重复本次实验。

b. 阳性质控有效性:

阳性质控所有 Marker 的 Ct 值 ≤ 38 ，Tm 值及 ΔCt 值在参考值范围内（表 4 和表 5），则阳性质控有效；反之，阳性质控无效，需重复本次实验。

内部质控:

- a. 内部质控 Marker QC 反映细胞数量和亚硫酸氢盐转化质量，用来评估非甲基化胞嘧啶 C 是否成功转化为尿嘧啶 U；如果样本 Marker QC 的 Ct 值和 Tm 值不在其参考值范围内（表 4），则该样本检测结果无效，需对其重新检测；
- b. 内部质控 Marker QM 是女性第二条 X 染色体上的甲基化基因，用于评估女性样本的正常甲基化状态；如果样本 Marker QM 的 Ct 值和 Tm 值不在其参考值范围内（表 4），则该样本检测结果无效，需对其重新检测。

表 4: Marker QC 及 Marker QM 的阳性判断值

标志物	Ct 值	Tm 值
Marker QC	$20 \leq Ct \text{ 值} \leq 36$	$77^{\circ}\text{C} \sim 81^{\circ}\text{C}$
Marker QM	≤ 42	$78^{\circ}\text{C} \sim 86^{\circ}\text{C}$

【阳性判断值】

使用人 ASTN1、DLX1、ITGA4、RXFP3、SOX17、ZNF671 基因甲基化检测试剂盒（荧光 PCR 法）和一代测序分别检测 636 例样本中 6 个基因的甲基化情况，以一代测序结果为金标准，采用 ROC 曲线法确定每个基因 ΔCt 值的阳性判断值。

以病理结果为金标准，采用逻辑回归分析方法确定模型中 6 个基因的权重，建立 6 个基因的评分，然后根据约登指数最大的原则确定最佳阈值，最终确定本试剂盒的阳性判断值为 3。当 6 个基因分值总和 < 3 时，样本检测结果为阴性；当 6 个基因分值总和 ≥ 3 时，样本检测结果为阳性。6 个基因阳性判断值及评分见表 5。

表 5：样本 Marker1~Marker6 阳性判断值及评分

标志物	Ct 值	Tm 值	ΔCt	Marker 阳性 评分	Marker 阴性 评分
ASTN1	Ct 值 < 42	79~84℃	≤ 9.00	1	0
DLX1	Ct 值 < 42	79~83℃	≤ 9.00	1	0
ITGA4	Ct 值 < 42	79~83℃	≤ 9.00	1	0
RXFP3	Ct 值 < 42	79~83℃	≤ 9.00	1	0
SOX17	Ct 值 < 42	79~85℃	≤ 9.00	1	0
ZNF671	Ct 值 < 42	79~86℃	≤ 10.00	3	0

注：当 Ct 值、Tm 值均在范围内，则计算 ΔCt 值，计算公式为：

$$\Delta Ct = Ct(\text{Marker X}) - Ct(\text{Marker QC})。$$

【检验结果的解释】

以 Marker1~Marker6 评分的总和评判样本的阴阳性：

- 当 Marker1~Marker6 分值总和低于 3，则样本检测结果为阴性，提示无宫颈病变或宫颈病变级别较低，可避免阴道镜及组织活检检查，做好定期复查；
- 当 Marker1~Marker6 分值总和等于或高于 3，则样本检测结果为阳性，提示宫颈病变级别较高，需进一步进行阴道镜和/或组织活检检查。

【检验方法的局限性】

- 配合使用的人乳头瘤病毒（HPV）核酸检测试剂盒，检测范围应包含 12 种高危 HPV 基因型 31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68 中的部分或全部。
- 样本检测结果阳性不能作为宫颈高级别病变及宫颈癌临床诊断的唯一依据，需结合其他的检查结果综合判断。

【产品性能指标】

- 最低检出限：本试剂盒检测 6 个基因甲基化比率的最低检出限为：

名称	最低检出限
ASTN1	0.4%
DLX1	2%
ITGA4	0.4%
RXFP3	0.4%
SOX17	4%
ZNF671	0.2%

- 阳性符合率：检测 7 份阳性参考品，检测结果应均为阳性。

3. 阴性符合率：检测 5 份阴性参考品，检测结果应均为阴性。
4. 精密度：重复检测精密度参考品 C1、C2，检测结果均为阳性且 Ct 值的变异系数（CV）应不大于 5.0%，检测精密度参考品 C3，检测结果均为阴性。
5. 稳定性：试剂盒置于 2~8℃ 保存至 12 个月，各项性能指标均应符合产品技术要求。
6. 交叉反应：交叉反应研究结果表明试剂盒检测非目标的其他基因甲基化阳性的宫颈脱落细胞样本，均无交叉反应。
7. 干扰试验：宫颈脱落细胞样本中含有 500mg/dL 血红蛋白、 1×10^6 个/mL 白细胞、宫颈粘液、20mg/mL 替硝唑阴道片、174mg/mL 保妇康栓、100mg/mL 重组干扰素 $\alpha 2b$ 凝胶、润滑剂，对本试剂盒的检测结果无影响。
8. 包容性：对不同宫颈癌组织类型样本的适用性进行研究，对宫颈癌组织类型为鳞癌、腺癌、腺鳞癌样本研究结果表明，本试剂盒适用于不同宫颈癌组织类型。
9. 临床试验结果：在 4 家临床试验机构进行临床试验，共纳入 1112 例病例，针对 30 岁以上 hrHPV 初筛阳性的人群，CIN2+水平，试剂盒的临床灵敏度为 86.21%，临床特异性为 93.97%；CIN3+水平，试剂盒的临床灵敏度为 95.35%，临床特异性为 86.20%。

【注意事项】

1. 本品仅用于体外诊断。本试剂盒的检测结果仅供临床参考，对患者的临床管理应结合其症状、体征、病史、其它实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。
2. 由于方法学或特异性等原因，使用不同生产商的试剂对同一份样本进行肿瘤标志物检测可能会得到不同的检测结果，因此，在肿瘤监测过程中，用不同试剂检测所得结果不应直接相互比较，以免造成错误的医学解释；建议实验室在发给临床医生的检测报告注明所用试剂特征。
3. 由于本产品的检测靶标为 DNA，操作过程中应特别注意防止 DNA 酶对 DNA 的降解作用，所有使用的器皿、加样器等均为专用，应使用无 DNA 酶的离心管、吸头等一次性耗材。
4. 检测前应完全理解本包装盒内产品和配套设备等说明书的内容及含义，以确保正确地使用本试剂盒。
5. 所有试剂应在规定的温度储存，使用时拿到室温下，使用后立即放回。试剂盒各组分使用前请充分摇匀，离心管内的试剂需离心数秒后使用。
6. 不可混用不同批号的试剂组分，不可使用超过有效期的试剂。
7. 每次实验需设置阴性质控和阳性质控。
8. 标本处理应在标本处理区进行，所有操作需采用无 DNA 酶的带滤芯枪头及离心管。
9. PCR 操作各阶段应在 PCR 实验室对应区域进行。应穿工作服，戴一次性手套（经常替换手套），使用一次性耗材。PCR 操作人员应具有相关实验经验和培训。
10. 临床实验室应严格按照《医疗机构临床基因扩增实验室管理办法》（现行有效版本）等有关分子生物学实验室、临床基因扩增实验室的管理规范执行。

【参考文献】

- [1]魏丽惠,赵超.宫颈癌及其癌前病变的筛查研究进展[J/CD].中华妇幼临床医学杂志(电子版). 2016,12(01):16-19.
- [2]Alfred Hansel, Daniel Steinbach, Christiane Greinke, Martina Schmitz, Juliane Eiselt, Cornelia Scheungraber, Mieczyslaw Gajda, Heike Hoyer, Ingo B. Runnebaum. A Promising DNA Methylation Signature for the Triage of High-Risk Human Papillomavirus DNA-Positive Women.PLOS ONE: 9 (3), March 2014.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：上海捷诺生物科技有限公司

住所：上海市徐汇区银都路 466 号 3 号楼 1 层

联系方式：电话：400-988-0666 邮编：200231

传真：021-64960972 网址：www.geneodx.com

售后服务单位名称：上海捷诺生物科技有限公司

联系方式：电话：400-988-0666 邮编：200231

传真：021-64960972 网址：www.geneodx.com

生产地址：上海市徐汇区银都路 218 号 3 号楼一层；

上海市徐汇区银都路 466 号 1 号楼 201、203 室；

上海市徐汇区龙吴路 2715 号 1 幢 104、106、108 室；

上海市徐汇区银都路 466 号 3 号楼 1 层。

生产许可证编号：沪药监械生产许 20202655 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

国械注准 20223401036

【说明书核准日期及修改日期】

核准日期：2022 年 08 月 04 日

修改日期：2022 年 08 月 30 日